

Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie, PŘF UK

Bakalářská práce na téma:

**Role adaptorového proteinu Daxx v regulaci transkripce a  
apoptózy**

**(The role of adaptor protein Daxx in the regulation of transcription and  
apoptosis)**

Vypracoval: Lucie Jarolímková  
3. ročník, Biologie

**Školitel: RNDr. Ladislav Anděra, CSc.**  
Ústav Molekulární Genetiky, AV ČR

Praha, květen 2007

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala **RNDr. Ladislavu Anděrovi, CSc.** za velkou pomoc při zpracování práce a cenné připomínky. Dále patří můj velký dík **Doc. RNDr. Františku Půtovi, CSc.** za pomoc při hledání vhodného tématu mé práce.

## Obsah

Poděkování.....	2
Obsah.....	3
1. Abstrakt.....	4
1.1. Abstract.....	4
2. Klíčová slova.....	5
2.1. Key words.....	5
3. Úvod.....	6
4. Rozdělení, indukce a regulace apoptózy .....	7
5. Iniclace a regulace transkripce.....	10
6. Adapterový protein Daxx.....	13
6.1. Struktura a lokalizace proteinu Daxx.....	13
6.2. Role proteinu Daxx v regulaci apoptózy .....	15
6.2.1 Daxx a Apotóza indukovaná membránovými receptory.....	15
6.2.2 Daxx a stresem indukovaná apoptóza.....	16
6.2.3 Antiapoptotická funkce proteinu Daxx .....	18
6.3. Úloha proteinu Daxx v regulaci transkripce.....	18
6.3.1. Role proteinu p53.....	19
6.4 Daxx a regulace virové exprese.....	21
7.Závěr.....	23
Použitá literatura.....	25

## 1. **Abstrakt**

*Adapterový protein Daxx je multifunkční faktor, který se prokazatelně účastní regulace transkripce, apoptózy a pravděpodobně i dalších buněčných procesů. Daxx je esenciální také pro embryonální vývoj – myší embrya s geneticky odstraněnou expresí Daxxu hynou v raných stádiích embryogeneze. Daxx, třebaže je převážně jaderný protein, se vyskytuje i v cytoplasmě, kde interaguje s některými membránovými receptory (Fas, TGFR1) a hraje roli při aktivaci Jun kinázové (JNK) signalizace. V buněčném jádře byla prokázána jeho interakce s plejádou nejrozličnějších proteinů od transkripčních faktorů (např. p53, Ets1, Pax5), přes epigenetické regulátory (histon deacetylázy, ATRX) až po s chromatinem asociované proteiny (PML, CENP-C). Nadprodukovaný Daxx převážně inhibuje transkripční aktivitu asociovaných transkripčních faktorů. Jeho transkripčně inhibiční funkce je spojována s jeho asociací s histon deacetylázami a také s jeho afinitou k SUMO modifikovaným proteinům. Potlačení či inaktivace exprese Daxxu vede na buněčné úrovni k urychlení buněčného cyklu a ke změně citlivosti buněk ke stresem indukované apoptóze. Vzhledem ke komplexitě jeho interakcí a jeho esenciálnímu významu pro embryogenezi, lze očekávat, že Daxx může hrát významnou roli i ve fyziologických procesech (např. v hematopoéze).*

### 1.1. **Abstract**

*The adapter protein Daxx is a multifunctional factor, which demonstrably participates in the regulation of transcription, apoptosis and probably also of other cellular processes. Daxx is essential also for the embryonic development - mouse embryos with homozygous Daxx deletion die at early stages of the embryogenesis. Although Daxx is predominantly a nuclear protein, it also localizes in the cytoplasm, where it was shown to interact with several membrane receptors (Fas, TGFR) and participate in activation of JUN-kinase (JNK) signalization. In the nucleus Daxx interacts with many different proteins as transcription factors (p53, Ets 1, Pax5), epigenetic regulators (histone deacetylases, ATRX) and chromatin-associated proteins (PML, CENP-C). Overexpressed Daxx mostly inhibits activity of the interacting transcription factors. Its transrepression function is probably linked to its association with*

*histone deacetylases and also with its affinity to SUMO-modified proteins. Suppression or inactivation of Daxx expression leads on cellular level to acceleration of the cell cycle and to change in sensitivity of these cells to stress-induced apoptosis. Due to complexity of its interactions and its essential role in embryogenesis, we can expect, that Daxx could also play a significant role in cellular physiological processes (for example hematopoiesis).*

## **2. Klíčová slova**

*Apoptóza, regulace transkripce, remodelace chromatinu, buněčný stres, p53, FAS, JNK, PML, ATRX, kaspáza*

### **2.1. Key words**

*Apoptosis, regulation of transcription, chromatin remodelling, cellular stress, p53, FAS, JNK, PML, ATRX, caspase*

### 3. Úvod

Apoptóza jakožto programovaná buněčná smrt je neodmyslitelně spjata nejen s embryogenezí a mnoha fyziologickými ději organismů, nýbrž je i součástí mnoha dějů patologických. Apoptóza hraje významnou roli při neurodegenerativních onemocněních (Parkinsonova, Huntingtonova či Alzheimerova choroba), autoimunitních chorobách či při ischemii neuronů či kardiomyocytů, etc. Patologicky působí nejen nadměrná apoptická aktivita, nýbrž i dysregulace ve směru opačném, jež je jedním z mechanismů, jimiž nádorové buňky získávají vyšší reprodukční potenciál. Podaří-li se nám pochopit mechanismy apoptózy ve všech jejích důsledcích, budeme schopni mnohem efektivněji do těchto patologických dějů zasahovat ve prospěch nemocných. Výzkum na poli regulace transkripce genů je neméně závažný. Po dokončení sekvenace genomu člověka a mnoha dalších organismů je před vědci další velmi náročný úkol, a to pochopit, jakými mechanismy je exprese genů regulována, ať již hovoříme o pochopení embryogeneze či expresní specifity tkání a jednotlivých buněk včetně buněk nádorových a buněk postižených germinálními či získanými mutacemi. Pochopením těchto složitých mechanismů by se nám otevřely zcela nové cesty k farmakologickému ovlivňování exprese buněk zdravých či jinak patologicky postižených potažmo i nové cesty v léčbě infekčních onemocnění.

Ve své bakalářské práci se snažím shrnout současné poznatky úlohy proteinu Daxx v regulaci transkripce a apoptózy. Vzhledem k tomu, že byla dokázána jeho účast v regulaci transkripce i apoptózy, lze očekávat, že po pochopení jeho významu budeme souvislostem mezi těmito ději rozumět více a tyto znalosti využijeme k terapeutickému ovlivnění patologických stavů souvisejících s regulací apoptózy a transkripce.

#### 4. Rozdělení, indukce a regulace apoptózy

Apoptóza (z řečtiny apo=z a ptosis=padání) je jeden z hlavních (nejčastějších) typů programované buněčné smrti (programmed cell death, PCD) buňky. Tento termín používaný v biologii použili poprvé roku 1972 Kerr, Wyllie a Currie pro zřetelně morfologicky odlišnou formu buněčné smrti.

Apoptóza, jedna z forem programované buněčné smrti, se u živočichů (obratlovců i bezobratlých) vyskytuje v průběhu ontogenetického vývoje. Do popředí zájmu molekulárních biologů se studium apoptózy dostalo teprve v posledním desetiletí. Nové poznatky ve výzkumu apoptózy umožnily pokrok v léčbě rakoviny a některých neurodegenerativních onemocnění.

Názory na apoptózu se vyvíjejí už téměř 150 let a prošly řadou proměn. Buněčná smrt je degenerativní proces vyvolaný např. poraněním. Změny, jež tento proces provázejí, jsou podobné posmrtnému rozkladu probíhajícímu u uhynulých organismů. V polovině 20. století si vědci všimli, že je buněčná smrt součástí normálního vývoje živočišných embryí. V 70. letech 20. století se začala buněčná smrt zkoumat systematicky a došlo ke spolehlivému odlišení jejích dvou typů – nekrózy a apoptózy. Nekróza byla definována jako pasivní buněčná smrt, jež se vyskytuje za nefyziologických podmínek. Nekróza postihuje skupiny buněk a v okolní tkáni vyvolává zánět. Apoptóza je, na rozdíl náhodné a ve většině případů aktivně neinicované nekrotické buněčné smrti, vysoce regulovaný a geneticky konzervovaný proces řízené, nezánětlivé likvidace buňky (Asahina-Jindrová et Jindra, 2003).

Při apoptóze se cytoplazma i jádro kondenzují a tvoří se váčky (apoptotická tělíska) obalené membránou, které obsahují organely, části cytoplazmy a jádra. Cytoplazmatická membrána a ostatní organely zůstávají nezměněny, iontová homeostáza je zachována. Nevratným stádiem apoptózy je aktivace nukleáz a destrukce jaderné DNA. Proces apoptózy vyžaduje energii (ATP) a neprobíhá při poklesu teploty na 4°C. Při nekróze se iontová homeostáza poruší a mitochondrie, cytoplazmatická membrána i jádro zvětšují svůj objem. Postupně se rozpadnou všechny organely a buněčné struktury, a nakonec i jaderná DNA. Proces nevyžaduje energii a probíhá i při 4°C. (Mlejnek, 2004)

Proces apoptózy má tři fáze – aktivační, regulační/amplifikační a efektorovou (destrukční) fázi. Podněty k aktivaci apoptózy jsou např. poškození buňky, stres nebo změna v hladině hormonů. V regulační fázi apoptózy lze proces buněčné

smrti zastavit a umožnit opravu poškozených buněčných struktur, či jej naopak amplifikovat a aktivovat specifické efektorové proteázy - kaspázy a nukleázy. Konečné stádium apoptózy je spojeno s destrukcí buněčných organel, proteinů a DNA, vytváření apoptotických tělísek a jejich následnou fagocytózou okolními buňkami či profesionálními fagocyty (např. makrofágy) (Chang et al., 1998).

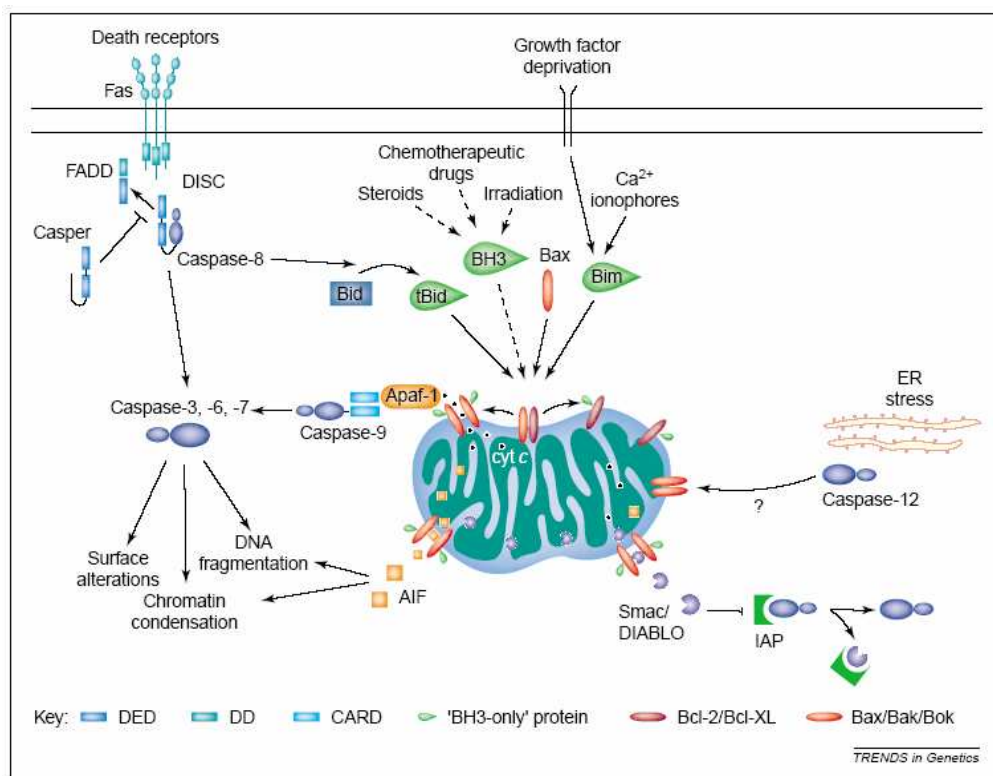
Existují však i druhy programované buněčné smrti, které mají morfologii spíše nekrotickou než apoptotickou, ačkoliv využívají aktivaci „apoptotických“ biochemických drah. Buněčná smrt však není stoprocentně spojena s určitým typem kontrolního nebo prováděcího mechanismu, apoptotická morfologie může být také na aktivaci kaspázových proteáz nezávislá. (De Maria et al., 1999)

Potlačením aktivity kaspáz nelze v exekčním stádiu ve většině případů buněčné smrti zabránit, ale lze jí pozměnit z apoptotické na nekrotickou. Z uvedených faktů vyplývá, že apoptóza a nekróza představují spíše alternativu buněčné smrti než protiklady. Nejnovější přístup ke klasifikaci programované buněčné smrti odhlíží od morfologických znaků a klade důraz na mechanismy spouštějící tento proces. Je možné identifikovat jednotlivé buněčné organely, které přijímají prvotní signály buněčné smrti a podle intenzity signálu spouštějí buď „obranou“ reakci, jež směřuje k rovnovážnému stavu (homeostázi) buňky, nebo programovanou buněčnou smrt, při extrémním podnětu či, když je apoptóza inhibovaná, eventuálně i nekrózu.

Apoptotický proces lze podle místa indukce v podstatě dělit na vnější a vnitřní. Mezi nejvýznamnější induktory buněčné smrti patří zejména s cytoplazmatickou membránou asociované „receptory smrti“ z rodiny TNFR. Vnitřní indukce apoptózy může být vyvolaná rovněž poškozením DNA, proteinů, organel, virovou infekcí či aktivací onkogenů. K mediátorům předávajícím signál z jádra dále patří některé proteinkinázy, protein p53 a významnou roli v aktivaci endogenní apoptotické signalizace hrají reaktivní kyslíkové radikály (ROS). Na zahájení apoptózy se podílí rovněž endoplazmatické retikulum, které uvolňuje vázané ionty vápníku a ovlivňují „skládání“ proteinů. V úvahu přichází rovněž Golgiho komplex, u kterého není jednoznačně prokázáno, zda funguje také jako senzor buněčného stresu. Lysozomy jsou mimořádně citlivé k působení reaktivních kyslíkových radikálů nebo některých toxických látek (antibiotika), jež iniciují změnu propustnosti jejich membrány (Storchová, 2005). Uvolněné lysozomální proteázy pak mohou aktivovat programovanou buněčnou smrt. Dominantní postavení při iniciaci a průběhu apoptózy a programované buněčné



smrti vůbec mají mitochondrie. Tyto orgány jsou nejen sběračem prvotních stimulů apoptózy, ale také přijímají druhotné signály z ostatních organel a buněčných struktur. Do mitochondrií směřují signální dráhy, které v konečném důsledku ovlivňují propustnost obou membrán. Vnější membrána začne propouštět proteiny (permeabilizace vnější mitochondriální membrány - MOMP) a vnitřní ionty, což vede ke zhroucení transmembránového potenciálu. Proteiny uvolněné z mezimembránového prostoru (cytochrom c, AIF, endonukleáza G) jsou esenciální pro aktivaci enzymů, jež se podílejí na destrukci buňky, zejména kaspázy a endonukleázy (Juo et al., 1998). Velmi významnou roli při iniciaci a regulaci mitochondriální apoptotické signalizace hrají proteiny rodiny Bcl-2 (Roset et al., 2007). Anti-apoptotické proteiny (např. Bcl-2 či Bcl-XL) apoptózu inhibují, pro-apoptotické proteiny z podskupiny Bax (Bax, Bak) aktivují MOMP a pro-apoptotické proteiny z BH3-pouze skupiny (např. Bid, Puma, Bim, Bad) pak inhibují anti-apoptotickou roli proteinů z Bcl-2 podskupiny:



Obr.1 Přehled signalizace během apoptózy v savčí buňce (Joza, Kroemer et Penninger, 2002)

## 5. Iniciace a regulace transkripce

Transkripce, přepis genetické informace z DNA do mRNA, je prvním krokem genové exprese a zároveň základní a klíčovou úrovní kontroly exprese genů. Transkripce je iniciována nasednutím komplexního mnohapodjednotkového TFIID (transcription factor II D) na sekvenci promotoru (nejčastěji TATA box). Vazba RNA-polymerázy II (Pol II) závisí na asociaci s komplexem TFIID, jež je tvořen TBP (TATA binding protein) a TAFs (TBP-associated factors). TFIID je na TATA sekvenci navázán přes TBP a interaguje s DPE (downstream promotor element) a INR (initiator element) – viz obr. 2. Dále dochází k připojení dalších transkripčních faktorů (TFII A-F,H) na iniciační komplex, přičemž vazbou TFIIH dochází k funkčně důležité fosforylaci Pol II, což je předpokladem pro uvolnění Pol II z tohoto komplexu. (Levine et Tjian, 2003, Thomas et Chiang, 2006).

Regulace genové exprese je komplikovaný proces ovlivnitelný na mnoha úrovních. Víme však, že pouze 2% lidského genomu jsou kódující, dle současných poznatků přibližně jeho 1/3 se podílí na regulaci exprese, replikaci, kondenzaci chromatinu či rozchodu chromozomů. Komplexita organismu roste právě s absolutním i relativním zastoupením regulujících genů (savci přibližně 5-10% genomu), přičemž u člověka lze předpokládat asi 3.000 transkripčních faktorů. Součástí transkripčního aparátu je komplex Pol II asociovaný s transkripčními faktory (TF), kofaktory (CRSP, Mediator) a chromatin remodelující a modifikující komplexy (SWI/SNF, Baf/Brm, Nurf). Tyto komplexy remodelují chromatin a kovalentně modifikují histony acetylací (histon acetyl transferázy) či mají aktivitu histon deacetyláz (HDAC). Na rozdíl od konzervovaných podjednotek Pol II a TFIID jsou nejvíce diverzifikovanou složkou iniciačního komplexu, jež se nejvíce podílí na komplexitě organismů, kofaktory a chromatin remodelující komplexy. Jejich evolucí se diverzifikovaly i sekvenčně specifické TF včetně jaderných SMAD, STATs. (Levine et Tjian, 2003)

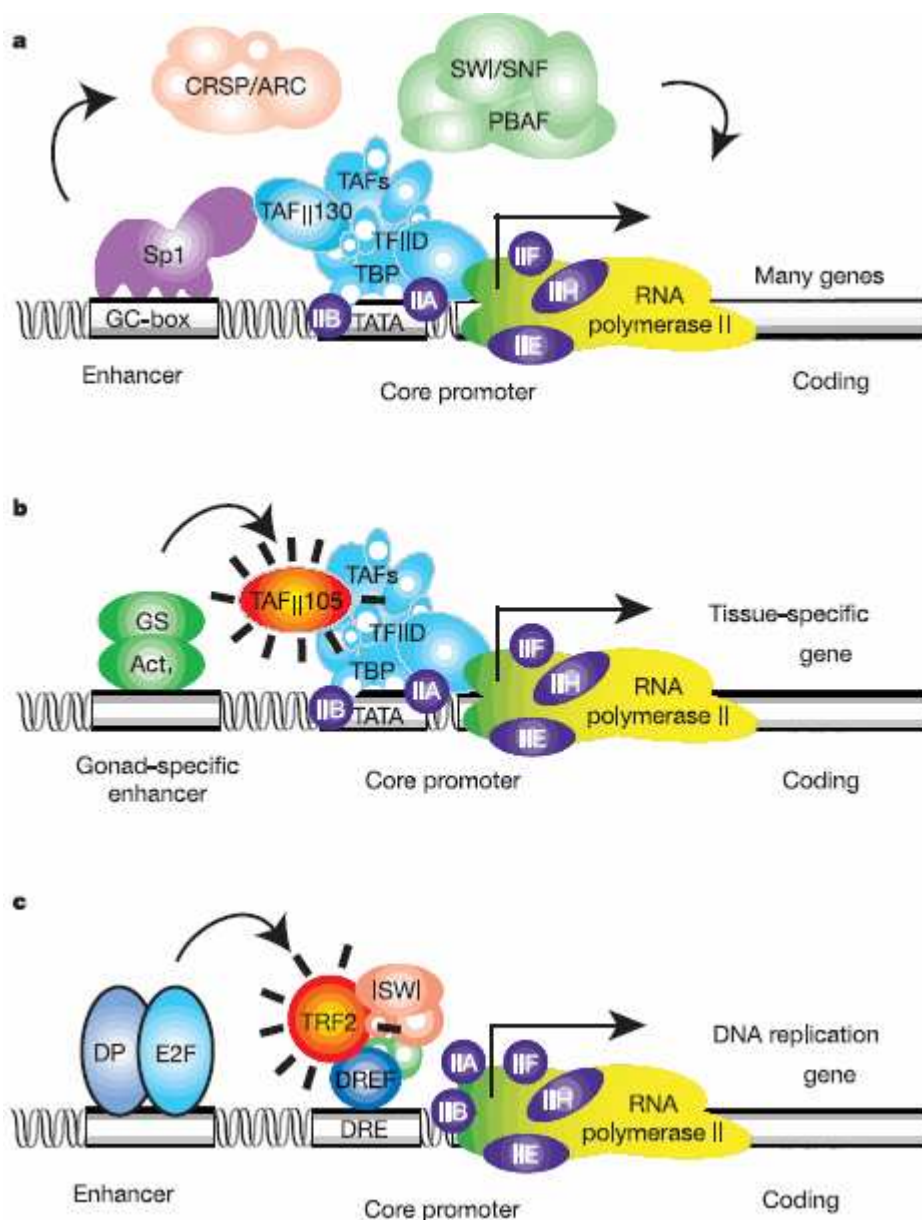
Aby byl daný gen exprimován, je nezbytná souhra mezi výše popsaným transkripčním aparátem (Pol II, TF a kofaktory a chromatin remodelujícími a modifikujícími komplexy) a enhancery se silencery, jež patří do tzv. cis regulační DNA, tzn. že se vyskytují na stejném chromozomu jako ovládaný promotor. Typický savčí enhancer je 500 bp dlouhý a má 10 vazných míst pro alespoň 3 odlišné sekvenčně specifické TF (často 2 jiné aktivátory a 1 represor).

Enhancery či silencery jsou umístěny v 5' či 3' směru od promotoru či v intronech. Enhancery jsou tkáňově specifické, čímž lze vysvětlit rozdíly v genové expresi u jednotlivých buněk. Enhancer může ovládat i z poměrně velké genové vzdálenosti jeden, avšak i více promotorů současně v obou směrech. Určitá kombinace regulačních faktorů (včetně TAFs či TRFs – TBP related factors ) v oblasti určitého promotoru je rozpoznána „jako kód“ určitými enhancery. Na kontaktu odpovídajících i vzdálených enhancerů s tímto komplexem se podílí mj. kofaktory a úseky DNA dlouhé 300 – 2000 bp s oblastmi vaznými pro motivy Zn prstů, tzv. insulátory (insulators)(Zhao et Dean, 2005). Tato regulační síť umožňuje velmi jemnou regulaci genů a jejich skupin.

Buňka má k dispozici ještě několik dalších mechanismů, jimiž může regulovat expresi genů. Uvedme amplifikaci genů, jejich přeskupení, posttranskripční úpravy RNA včetně vazby interferenčních RNA na hnRNA a remodelaci chromatinu. DNA a histony mohou být chemicky modifikovány methylací, acetylací, fosforylací, ubikvitinací nebo sumolací. U savců jsou metylovány heterochromatinové úseky DNA, konkrétně cytosiny v CpG oblastech. Různé typy kovalentních modifikací mohou ovlivnit dynamickou strukturu nukleosomu, a tak přispět k míře přístupnosti proteinových faktorů k DNA. Histony jsou postranslačně modifikovány na aminokyselinových zbytcích lysinů v N-terminálních koncích, které nejsou součástí jádra nukleosomu, ale vybíhají do stran a tvoří tzv. volné konce. Acetylace histonů je spojena s transkripční aktivitou chromatinu (dojde tím k „neutralizaci“ bazických histonů a rozvolnění jejich vazby k DNA), zatímco hypoacetylace histonů signalizuje transkripčně inaktivní chromatin.(Levine et Tjian, 2003)

Velmi všestranným jaderným kompartmentem jsou PML tělíska (PML-NB, promyelotic leukemia nuclear body). Jde o strukturované proteinové komplexy asociované s jadernou matrix (Takahashi et al., 2004), které jsou zapojeny v transkripci a opravě DNA, ochraně před virovou infekcí a stresem, v regulaci buněčného cyklu, proteolýze a apoptóze. Vazba partnerských proteinů (jako například transkripční represor Daxx nebo aktivátor transkripce p53) na NBs je regulována specifickou postranslační modifikací PML zvanou sumoylace. Většina z těchto partnerských proteinů se účastní aktivace či represe transkripce. S PML asociuje i antionkogen protein p53, který je jedním z nejvýznamnějších intracelulárních inhibitorů nádorové transformace. p53 také

interaguje s chromatin remodelačním SWI/SNF komplexem a tato interakce je důležitá pro regulaci exprese p53 transaktivovaných genů a regulaci buněčného cyklu (Lee et al.,2002; Sansam et Roberts, 2005).



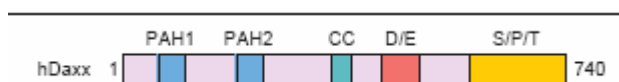
Obr.2 Iniciace a regulace transkripce(Levine et Tjian,2003)

## 6. Adapterový protein Daxx

Přítomnost proteinu Daxx (FAS Death domain associated protein x) spojovaného s regulací procesů souvisejících s programovanou buněčnou smrtí a s regulací transkripce byla prokázána jak v cytoplazmě, tak i v jádře eukaryotických buněk obratlovců. Jaderný Daxx se pravděpodobně podílí na regulaci rozvoje promyelocytické leukémie (PML) a  $\alpha$ -talasémie. Cytoplazmatická forma Daxxu je komponentem systému proteinů, které rozhodují o spuštění procesů vedoucích ke smrti buňky. Přesná úloha v regulaci vstupu do apoptózy či jiné formy buněčné smrti není dosud známa (Raoul et al., 2005). Původně byl popsán jako adapterový protein interagující s intracelulární částí „receptoru smrti“ Fas/CD59, který skrze aktivaci JNK kináz pozitivně ovlivňoval apoptózu indukovanou tímto receptorem (Yang et al., 1997). V průběhu následujících let pak bylo zjištěno, že v buněčném jádře lokalizovaný Daxx je součástí tzv. PML tělísek, kde přímo interaguje s proteinem PML. Jaderně lokalizovaný Daxx interaguje s řadou transkripčních faktorů a ovlivňuje expresi mnoha genů (Salomoni et Pandolfi, 2006).

### 6.1. Struktura a lokalizace proteinu Daxx

Terciální struktura proteinu Daxx není doposud známa. Jeho sekundární struktura se vyznačuje amfipatickými helixy (tzv. Paired Amphipatic Helix – PAH doménami) na N – konci, acidickou centrální oblastí, na serin/prolin/treonin bohatou oblastí na C – konci a C-koncovým motivem rozpoznávajícím SUMO modifikované proteiny (Lin et al, 2006) .



Obr.3 Daxx(Salomoni et Khelifi, 2006),upraveno

PAH- paired amphipatic helix

CC- coil-coiled motiv

D/E- kyselá oblast

S/P/T- serin/prolin/threonin bohatá oblast

Daxx je exprimován ve všech tkáních, ve velkém množství v hematopoietických buňkách, brzlíku a varlatech (Salomoni et Pandolfi, 2006). V buňkách Daxx interaguje s množstvím proteinů a strukturních motivů. Otázkou však zůstává, které z těchto reakcí jsou relevantní a které probíhají i za fyziologických podmínek (Charette et Landry, 2000)

V myších fibroblastech je Daxx lokalizován společně se svým interagujícím proteinem chromatin remodelující ATPázou ATRX poblíž centromerického heterochromatinu, a to zejména během S-fáze buněčného cyklu. Spojitost mezi těmito proteiny a buněčným cyklem se prokázala v případě Daxx – deficientních buněk, u nichž došlo k urychlení S fáze a vytvoření dvoujaderných buněk. Komplex Daxx-ATRX je tedy důležitý v okamžiku vstupu buňky do S fáze a může hrát roli při regulaci uspořádání chromatinu během buněčného cyklu. Přesná role Daxx proteinu v procesu remodelace chromatinu není však doposud jednoznačně definována. Mutace genu pro ATRX jsou základní příčinou syndromu mentální retardace spojeného se současným výskytem  $\alpha$ -talasémie (ATR-X). (Perlman et al., 2001) Během interfáze interaguje Daxx s proteinem C umístěným rovněž v oblasti centroméry. V oblasti centromér se tedy nacházejí oblasti sloužící spolu s proteinem Daxx jako indikátory poškození buněk během mitózy. Není vyloučeno, že se protein Daxx podílí i na jiných funkcích regulace buněčného cyklu (Tang et al., 2004).

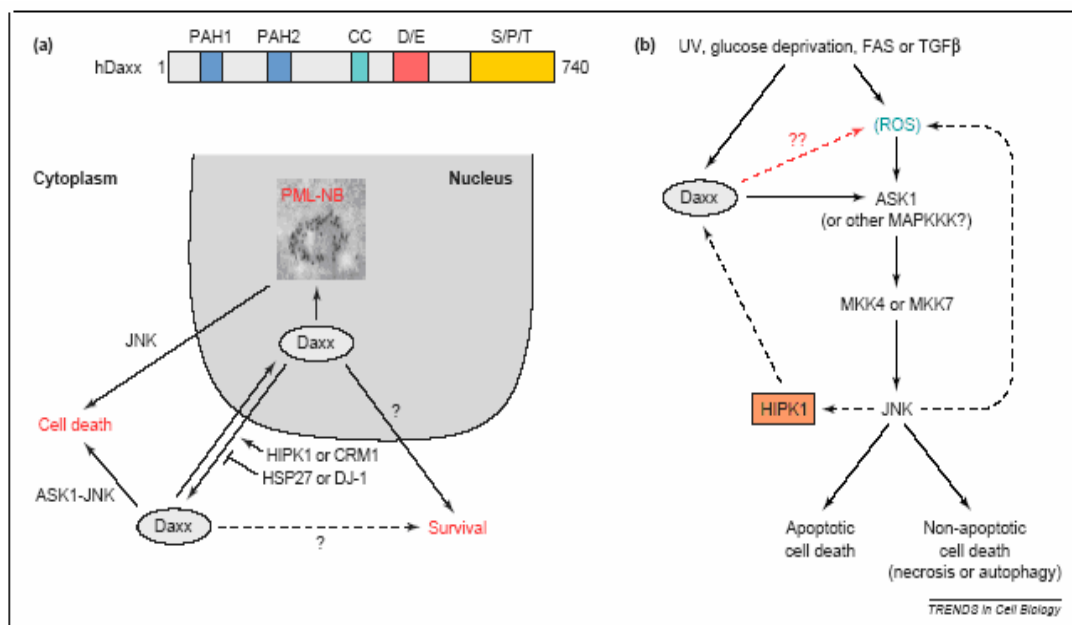
Transport proteinu Daxx mezi buněčným jádrem a cytoplasmou je regulovaný proces indukovaný specifickými stimuly. Mezi ně patří např. aktivace Fas iniciované signalizace, oxidativní stres či snížení hladiny glukózy. Tyto stimuly aktivují jeho transport do cytoplasmy kde se Daxx zúčastní mimo jiné i aktivace kinázy ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1). Tato kináza je jedním z enzymů spouštějících apoptotické procesy (Song et Lee, 2003). Samotný transport proteinu Daxx z jádra do cytoplasmy během glukózové deprivace umožňuje interakce jeho C – konce s jaderným transportním proteinem CRM1. Otázkou však zůstává, jak je regulován jaderný export Daxxu po aktivaci Fas či TGF $\beta$  indukované signalizace (Daxx interaguje s TGF $\beta$  receptorem TGFR1). (Hofmann et al., 2003).

Některé současné studie poukazují na to, že jaderným lokalizačním signálem by mohla být jeho vazba na SUMO (small ubiquitin-related modifier) také zřejmě pomocí jeho C-koncové domény. Přesný mechanismus této interakce není ještě znám. (Lin et al., 2006; Chen et al., 2006)

## 6.2. Role proteinu Daxx v regulaci apoptózy

### 6.2.1. *Daxx a Apoptóza indukovaná membránovými receptory*

Protein Daxx interaguje s proapoptotickými receptory jako jsou FAS a TGF $\beta$ . Základní signální kaskáda aktivovaná z receptoru Fas je aktivace apoptózy závislá na vytváření receptorového komplexu adapterového proteinu FADD s iniciační prokaspázou 8. Při Fas indukované apoptóze se Daxx účastní aktivace c-Jun-N-terminální kinázy (JNK). Kaskáda JNK se podílí na regulaci stresem vyvolané buněčné smrti a je nezbytná v procesu programované buněčné smrti v průběhu vývoje nervového systému (Falbo et Shen, 2006). Dalším popsáním článkem v kaskádě FAS-Daxx je p38MAP kináza (MAP=mitogen activated kinase). Tak jako se podílí protein Daxx na aktivaci JNK a p38, je velmi pravděpodobné, že reguluje i činnost ostatních kináz účastnících se v procesu apoptózy.



Obr.4 – Regulace programované buněčné smrti vlivem proteinu Daxx na JNK kaskádu (Salomoni et Khelifi, 2006)

Přestože byl význam proteinu Daxx v Fas indukované apoptóze několikrát zpochybňován (Torii et al, 1999; Villunger et al, 2000), tak recentní práce využívající exprese dominant negativní C koncové části Daxx v motoneuronech

či T lymfocytech dokazují, že minimálně v těchto buněčných typech se Daxx apoptózy indukované z Fas receptoru aktivně účastní (Leal-Sanchez et al, 2007). Z uvedených publikací také vyplývá, že kaskáda Daxx-JNK reguluje apoptózu vyvolanou stimulací receptoru FAS nezávisle na FADD zprostředkované aktivaci kaspáz. Nadto může protein Daxx regulovat i ostatní neapoptotické procesy vyvolané stimulací receptoru FAS - například průběh erytropoezy, kde k buněčné smrti nedochází (Socolovsky, 2007).

Exprese genu pro protein Daxx byla prokázána i v případech, kdy apoptotické procesy nevyvolala stimulace receptoru FAS, nýbrž receptoru TGF $\beta$ . Tento receptor se podílí na regulaci vývoje buněk, buněčné proliferace, diferenciaci i apoptózy v nejrůznějších tkáních. Studie provedené na kvasinkových kulturách ukázaly, že protein Daxx reaguje s cytoplasmatickým koncem receptoru TGF $\beta$ . C-koncová část Daxxu inhibuje apoptózu vyvolanou stimulací receptoru TGF $\beta$  a aktivaci JNK. Je rovněž zajímavé, že kináza HIPK2 fosforyluje protein Daxx při aktivaci receptoru TGF $\beta$  v případě, že spolu s proteinem Daxx dochází i k aktivaci JNK. Zdá se tedy, že jaderná kináza HIPK2 a protein Daxx se společně účastní apoptotické signalizace z aktivovaného receptoru pro TGF $\beta$  a jsou v rámci tohoto procesu aktivovány (Ko et al., 2001).

#### 6.2.2. Úloha proteinu Daxx ve stresem indukované apoptóze

Daxx zřejmě hraje významnou roli i při aktivaci stresem indukované buněčné smrti. Jeho exprese je zvýšena v průběhu oxidativního stresu (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -peroxid vodíku) či po ozáření buněk UV světlem (Kim et al, 2005; Khelefi et al; 2005). Potlačení exprese Daxx pomocí siRNA vedlo v těchto případech k částečné inhibici H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> či UV indukované apoptózy primárních lidských fibroblastů. V případě snížené hladiny glukózy je protein Daxx fosforylován kinázou HIPK1 a přesunut z jádra do cytoplasmy, kde interaguje s ASK1. Kináza ASK1 se s největší pravděpodobností účastní i aktivace JNK (Juo et al., 1998; Submayev et Yasinska, 2006). Daxx se také aktivně účastní apoptózy indukované oxidativním stresem v neuronech při Parkinsonově chorobě. Jeho jaderný negativní regulátor protein DJ-1 je mutován u těchto pacientů a tudíž Daxx může v cytoplasmě aktivovat na ASK1 závislou apoptotickou signalizaci (Junn et al, 2005). Stresem indukovaná apoptóza a také apoptóza B buněk vyvolaná



interferony  $\alpha/\beta$  (IFN $\alpha/\beta$ ) (Gongora et al, 2001) je do určité míry nezávislá na aktivaci kaspáz, avšak zcela závislá na aktivaci JNK kináz. V případě interferony aktivované apoptózy hraje esenciální úlohu protein kináza Tyk2, která se zúčastní aktivace cytoplasmatické translokace Daxxu (Shimoda et al, 2002). U prekurzorů B-lymfocytů je regulátorem proapoptotické funkce proteinu Daxx aktivované interferony protein PML (Lucianni et al., 2006).

Několik studií z posledních let věnovaných proteinu Daxx potvrzuje jeho roli i v apoptotických procesech, na nichž se nepodílí enzym kaspáza. Úlohu hraje protein Daxx nejen v průběhu apoptózy za spoluúčasti kaspázy a JNK, ale také v případě na kaspázách nezávislých typů buněčné smrti jakými jsou nekróza a autofagie (Allard, Mason et Cote, 2004). Po transfekci buněk kinázou ASK1 došlo k translokaci proteinu Daxx z buněčného jádra do cytoplasmy a k indukci na kaspázách nezávislé buněčné smrti (Michaelson et Leder, 2003).

Potlačení exprese Daxx v primárních lidských fibroblastech vede k jejich rezistenci vůči UV- a oxidativnímu stresu. Bylo rovněž prokázáno, že naopak UV- a oxidativní stres vedou k omezení transportu proteinu Daxx z buněčného jádra do cytoplasmy a snížení jeho schopnosti asociace s PML-NB (Jung et al., 2007). V rakovinných buněčných liniích je protein Daxx více heterogenní a jeho lokalizace není omezena na PML-NB, což vypovídá o jistém selekčním tlaku a schopnosti organismů přizpůsobit se měnícím se podmínkám. Dále bylo prokázáno, že u rakovinných buněčných linií mění protein Daxx nebo minimálně upravuje své funkce podle činnosti a lokalizace svých tumor-specifických partnerů. UV- a oxidativní stres vyvolávají u primárních fibroblastů buněčnou smrt bez nutnosti aktivovat kaspázu nebo zvýšit hladinu proteinu p53. (Jung et al., 2007) Zdá se, že protein Daxx je také schopen regulovat neapoptotické typy buněčné smrti (Leroy et al., 2006). Protein Daxx se dále podílí na aktivaci JNK vyvolané UV zářením a působením peroxidů vodíku. Pod vlivem UV záření dochází k přechodnému přesunu ASK1 z jádra, zdá se tedy, že signál k aktivaci kináz vychází z jádra. Dosud je však nejasné, zda po ozáření kultury UV paprsky protein Daxx asociuje s ASK1 přímo. Podle současných představ a modelů protein Daxx asociuje s ostatními komponentami JNK kaskády, do procesu signalizace jsou pravděpodobně zapojeny i součásti cytoskeletu – například protein JIP. Interakce je v tomto případě zprostředkována na prolin bohaté doméně na C-konci tohoto proteinu (Raoul et al., 2002; Submayev et Yasinska, 2006).

JNK se ukázala být hlavním regulačním faktorem na kaspázách nezávislé programované buněčné smrti. V případě absence funkční kaspázy spouští JNK autofagickou formu buněčné smrti, která je typická destrukcí cytoplasmy za pomoci lyzozomálních proteáz a výskytem cytoplasmatických měchýřků obalených dvojitou nebo i trojitou membránou. Tyto měchýřky pohlcují části cytoplasmy a buněčných organel. V případě aktivace receptoru pro TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) za předpokladu absence funkční NF- $\kappa$ B kaskády (nuclear factor kappa-B) JNK aktivuje nekróze podobnou buněčnou smrt doprovázenou zvýšenou produkcí ROS (Bubici et al., 2006).

### 6.2.3. Antiapoptotická funkce proteinu Daxx

Navzdory studiím jednoznačně potvrzujícím úlohu proteinu Daxx v procesu apoptózy, jiné práce dokládají i jeho negativní vliv na indukci a průběh buněčné smrti (Leroy et al., 2006). Daxx-deficitní (Daxx<sup>-/-</sup>) myší embryonální buňky mají zvýšenou spontánní apoptózu a Daxx<sup>-/-</sup> myší embrya hynou v 9. dnu embryogeneze se známkami všeobecné masivní apoptózy (Michaelson et al., 1999)

Potlačení exprese Daxx pomocí RNAi v HeLa buňkách zvýšilo jejich citlivost k UV a TNF $\alpha$  indukované apoptóze (Perlman et al., 2001).

Nadprodukce proteinu Daxx také částečně inhibovala apoptózu erytromyeloidních TF1 buněk indukovanou z protilátkou aktivovaného receptoru CD43 (Čermák et al, 2002)

## 6.3. Úloha proteinu Daxx v regulaci transkripce

Jaderná lokalizace proteinu Daxx poukázala na jeho možnou účast v regulaci transkripce. Ačkoliv nebyla dosud popsána ve struktuře proteinu Daxx žádná doména schopná vazby s DNA, přítomnost dvou amfipatických helixů (PAH domén) se strukturou shodnou s korepresory (např. Sin3A) podporuje jeho možnou korepresivní funkci. (Salomoni et Khelifi, 2006)

Nadprodukovaný Daxx potlačuje transaktivační funkce několika transkripčních faktorů (Pax3, ETS1, E2F1, p53, p73) a podílí na inhibici a interakcích se Smad4, ke kterým dochází po stimulaci receptoru TGF $\beta$ . Pro transrepresivní funkci Daxx se zdá být významnou jeho interakce s histonovou

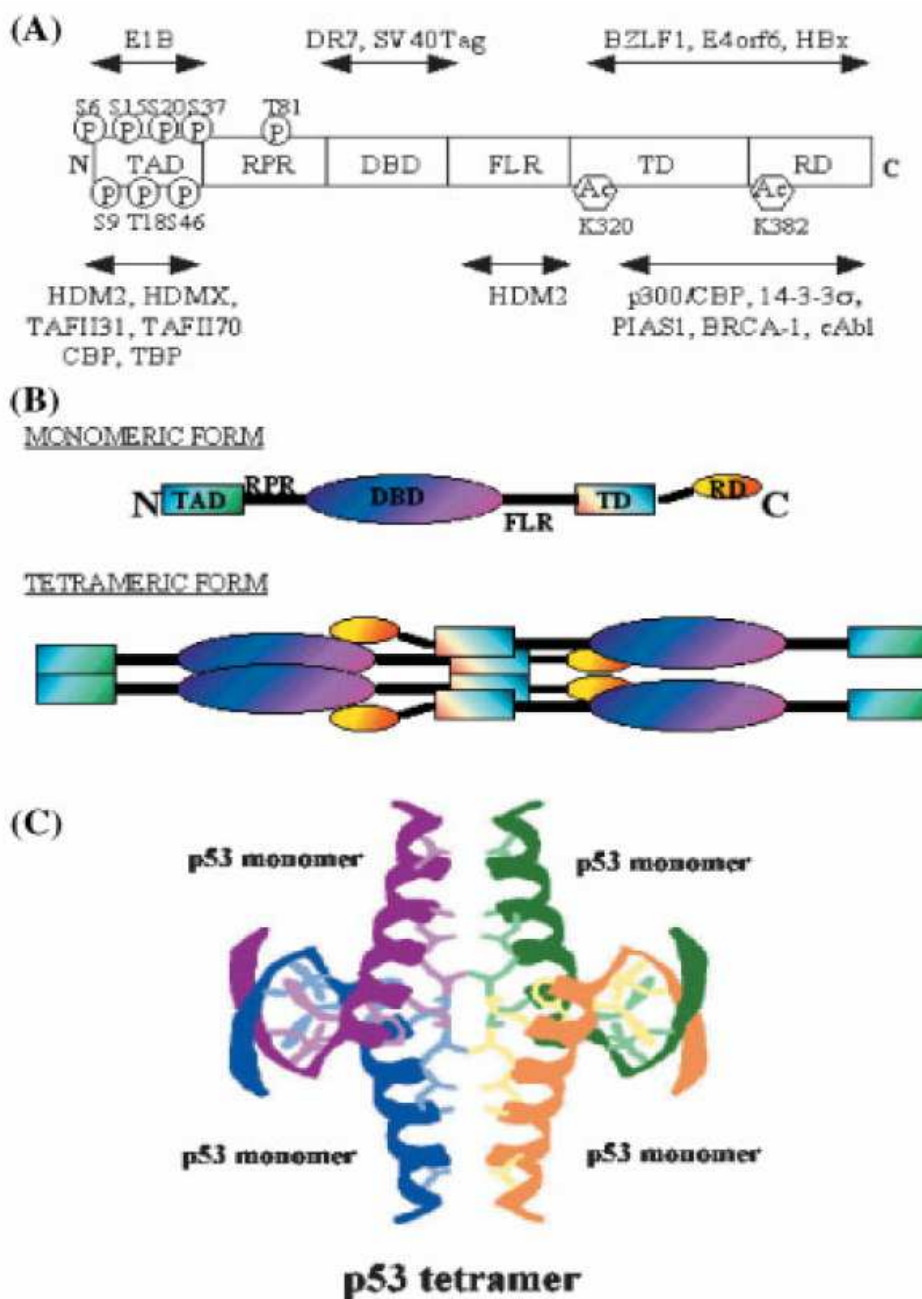
deacetylázou II, jadernými histony a s chromatinem asociovaným proteinem DEK. Je zajímavé, že schopnost proteinu Daxx reprimovat transkripci je inhibována v případě jeho asociace s PML-NB.(Takahashi et al.,2004) U Pml<sup>-/-</sup> buněk je protein Daxx asociován s heterochromatickými regiony, které obsahují transkripčně neaktivní chromatin. Daxx se rovněž účastní regulace aktivity „heat shock“ transkripčních faktorů a expres „heat shock“ proteinů (Nefkens et al.,2003; Boellmann et al., 2004) .

#### 6.3.1. Role proteinu p53

P53 je multifaktoriální transkripční faktor, který se účastní regulace buněčného cyklu, apoptózy, oprav DNA či její rekombinace a buněčné diferenciace a senescence. Byl objeven před 25 lety jako onkogen interagující s SV40 T-antigenu. Později bylo prokázáno, že jeho onkogenní role souvisí s bodovými mutacemi a pravá funkce p53 je inhibice nádorové transformace .(Bensaad et Vousden, 2007) Inaktivace p53 je jedním z hlavních důvodů nádorové transformace a jeho mutace se vyskytují ve více než 70% lidských nádorů.

Jednou z hlavních tumor-supresorových funkcí p53 je jeho schopnost aktivovat apoptotické dráhy, a to jak vnitřní, tak i vnější. Za normálních okolností je v buňce udržována hladina p53 nízká pomocí ubiquitinylatione jeho regulátorem mdm2. Pokud dojde k poškození DNA,aktivaci onkogenu či hypoxii, p53 je postranlačně modifikován-aktivován fosforylací.

Terciální strukturou je p53 tetramer:



Obr. 5 - Struktura proteinu p53(L. Anděra, 2007)

TAD-transkripční aktivační doména

RPR-rich proline region-region bohatý na prolin

TD- tetramerisation domain- doména zajišťující tetramerizaci

RD-regulation domain- regulační doména

FLR-flexible links region- region zajišťující interakce

P53 je schopen regulovat expresi mnoha genů uplatňujících se v apoptóze. Například dokáže zvýšit expresi receptorů proapoptotických molekul, jako je FAS/CD45 nebo proapoptotických faktorů jako Bax (Bcl2 associated x protein), PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) či NOXA (z latinského výrazu pro zkázu, zničení). P53 rovněž reguluje geny kódující APAF-1 (apoptotic protease-activating factor 1), klíčovou komponentu apoptozómu. Oproti tomu, p53 inhibuje aktivitu antiapoptotických molekul (Bcl 2, Bcl-x) v mitochondriích. (Moll et al., 2005)

V posledních letech byla prokázána souvislost mezi proteinem Daxx a proteinem P53. Daxx asociuje přímo s p53, a to vazbou na COOH doménu proteinu p53. (Yeung et al., 2007) Zdá se, že Daxx zamezuje jak jeho transkripčním, tak i apoptotickým aktivitám a tím ovlivňuje apoptózu na nejzákladnější-transkripční úrovni. Protein Daxx však může být za určitých okolností i pozitivním regulátorem transkripční funkce p53. Daxx spoluvytváří komplex mezi p53, Aminem a HIPK2 a zprostředkuje tak HIPK2 katalyzovanou fosforylaci a aktivaci p53 (Li et al., 2007)

#### **6.4. Daxx a regulace virové exprese**

PML-NB ( někdy také nazýváno ND 10) sestává z mnoha faktorů, především PML, Sp 100 a hDaxx. Některé studie dokazují, že ND 10 přispívá k buněčným antivirovým ochranným mechanismům, a to asociací například s DNA viry replikujícími se v jádře a je modifikováno virovými regulačními proteiny. Tato modifikace většinou souvisí s efektivitou virové infekce. (Roger et al., 2006). PML se účastní regulace virové exprese u mnoha RNA virů (HCV), adenovirů, lidského cytomegaloviru (HCMV) či HSV 1 (herpes virus1).

Protein pp71 z HCMV viru, interaguje s Daxxem a inaktivuje jeho proapoptotickou aktivitu (Saffert et Kalejta, 2007) Ukazuje se ale, že buněčná odpověď, jež reprimuje virovou expresi, není úplně znemožněna, jelikož protein Daxx se nachází v různých buněčných kompartmentech. Pro navození své latentní fáze musí virus potlačit svoji genovou expresi a využívá k tomu Daxx-zprostředkovaný mechanismus buněčné imunitní odpovědi. (Roger et al., 2006) Inaktivace Daxx vede k masivní virové infekci, oproti tomu jeho nadprodukce činí buňku odolnou vůči rané genové expresi viru. (Saffert et Kalejta, 2007)

Současné studie poukazují na to, že represe virové transkripce je zprostředkována přímým a okamžitým efektem proteinu Daxx na modifikaci chromatinu okolo časného virového promotoru(Woodhall et al., 2006).

RNA virus HCV způsobuje hepatocelulární karcinom. V souvislosti s výzkumem této nemoci byla prokázána vzrůstající exprese Daxx jako antiapoptotického faktoru pod vlivem HCV. To viru zajišťuje persistenci v hepatocytech, aniž by se v těchto buňkách indukovala apoptóza.(Nguyen et al.,2006)

*Tab. 1 – Proteiny reagující s proteinem Daxx a jejich potenciální funkce (Salomoni et Khelifi, 2006), upraveno*

<b>Název proteinu</b>	<b>Funkce</b>	<b>Funkční následky</b>
FAS	Receptor	Apoptóza
ASK1	proapoptotická kináza	Apoptóza
Pml	Tumorsupresor	Inhibice Apoptózy
TGFβRII	Tumorsupresor	Apoptóza
HSP27	Chaperon	přežití buňky
Pax3	transkripční faktor, diferenciací buňky	represe Pax3 transkripční aktivity
ETS1	transkripční faktor	represe Ets1 transaktivovaných genů
Pax5	transkripční faktor, vývoj B – lymfocytů	Represe nebo aktivace transkripční aktivity Pax5
HIPK1	kináza, apoptóza	apoptotická regulace subcelulární lokalizace proteinu Daxx, represor jeho transkripční aktivity
HIPK2	kináza, apoptóza	Apoptóza, regulace transkripce
ZIPK	proapoptotická kináza	Apoptóza
P53	antionkogen, transkripční faktor	Regulace p53 transkripční aktivity
HSF1	transkripční faktor aktivovaný teplotním šokem, přežití buňky	Regulace transkripční aktivity HSF1

DMAP1	transkripční korepresor	transkripční represe
Smad4	transkripční faktor,	represe transkripční aktivity Smad4
DJ-1	20-kDa protein mutovaný v časných stadiích rozvoje Parkinsonovy choroby	Inhibice procesu programované buněčné smrti spuštěné cestou Daxx/ASK1

*Tab. 2 – Proteiny reagující s proteinem Daxx, jejichž funkční následky nejsou známy( Salomoni et Khelifi, 2006), upraveno*

Název proteinu	Funkce
Sentrin a Ubc9	Modifikace proteinů
Glut4	Transport glukózy
CENP-C	Součást centroméry
ATRX	Remodelace chromatinu, přežití buňky
Komplex zahrnující H2A, H2B, H3, H4, HDACII, Dek HIPK3	Součást chromatinu, modifikátor kinázy inhibující JNK

## 7. Závěr

Podle doposud publikovaných výsledků je Daxx významným regulátorem apoptózy indukované jak membránovými receptory, tak buněčným stresem a transkripce. Mezi hlavní otázky, které budou řešeny v budoucnosti, patří stanovení přesného mechanismu, jakým protein Daxx tyto procesy ovlivňuje. Mezi tyto zatím nedořešené problémy patří:

- 7.1. Jakým mechanismem ovlivňuje protein Daxx proces programované buněčné smrti a aktivitu stresových kináz?
- 7.2. Působí protein Daxx na aktivitu komponent JNK kaskády v jádře?
- 7.3. Je protein Daxx schopen regulovat i jiné apikální kinázy než je ASK1?
- 7.4. Jaký faktor reguluje přesun proteinu Daxx mezi buněčnými organelami?
- 7.5. Jak ovlivňuje aktuální lokalizace proteinu Daxx jeho schopnost modulace transkripce?

#### 7.6. Souhlasí celkově chování proteinu Daxx s jeho účastí na procesu regulace programované buněčné smrti?

Konečně dosud nebyla vyřešena otázka, zda se lidský protein Daxx nemění za podmínek provázejících patologické změny buněk a jaké následky může mít „šok“ způsobený funkční inaktivací proteinu Daxx v průběhu rozvoje neurodegenerativních chorob a nádorové transformace. Jedna z největších výzev pro budoucí výzkum spočívá ve vývoji vhodného a účelného zvířecího modelu, který by mohl být použit při analýze funkcí proteinu Daxx in vivo.



## Seznam literatury

- 1. Allard, S., Mason, J. Y. et Cote, J. (2004):** Chromatin remodeling and the maintenance of genome integrity. Bioch. et Bioph. A. 1677, 158-164
- 2. Anděra, L.(2007):** Molekulární mechanismy apoptózy; přednáška PŘ.F. UK
- 3. Asahina-Jindrová, M. et Jindra, M. (2003):** Hádátka a genetická regulace buněčného osudu. Vesmír 82, 133–135
- 4. Bensaad K, Vousden KH(2007):** p53:new role in metabolism; Trends Cell Biol. 2007 Jun;17(6):286-91. Epub 2007 May 3.
- 5. Boellmann F, Guettouche T, Guo Y, Fenna M, Mnayer L, Voellmy R(2004):** daxx interacts with heat shock factor 1 during stress activation and enhances its transcriptional activity.; Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Mar 23;101(12):4100-5.
- 6. Bubici C, Papa S, Dean K, Franzoso G(2006):** Mutual cross-talk between reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B:molecular basis and biological significance; Oncogene. 2006 Oct 30;25(51):6731-48
- 7. Bubici C, Papa S, Pham CG, Zazzeroni F, Franzoso G(2006):** The NF-kappaB-mediated control of ROS and JNK signaling.; Histol Histopathol. 2006 Jan;21(1):69-80
- 8. Cairns, B. R. (2005):** Chromatin remodeling complexes: strength diversity, precision through specialization. Curr. Op. in Genet. 15, 185-190
- 9. Cermák L, Símová S, Pintzas A, Horejsí V, Andera L(2002):** Molecular mechanisms involved in CD43-mediated apoptosis of TF-1 cells. Roles of transcription Daxx expression, and adhesion molecules.; J Biol Chem. 2002 Mar 8;277(10):7955-61. Epub 2001 Dec 31.
- 10. De Maria, R. et al. (1999):**Negative regulation of erythropoiesis sy caspase-mediated cleavage of GATA-1. Nature 401, 489 – 493
- 11. Everett,Roger,D., Sabine Rechter, Peer Papior, Nina Tavalai, Thomas Stamminger, and Anne Orr(2006):** PML Contributes to a Cellular Mechanism of Repression of Herpes Simplex Virus Type 1 Infection That Is Inactivated by ICP0; J Virol. 2006 August; 80(16): 7995–8005.
- 12. Falbo, K. B. et Shen, X. (2006):** Chromatin remodeling in DNA replication. J. Cell. Bioch. 97, 684-689
- 13. Hofmann, T. G. et al (2003):** HIPK2 regulates transforming grows factor-beta-induced c-Jun NH(2)-terminal kinase activation and apoptosis in human hepatoma cells.Cancer Res. 63, 8271–8277

- 14. Chang, H. Y. et al. (1998):** Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science* 281, 1860 – 1863
- 15. Chen A, Wang P.Y., Yang Y.C., Huang Y.H., Yeh J.J., Chou Y.H., Cheng J.T., Hong Y.R.(2006):** SUMO regulates the cytoplasmic nuclear transport of its target protein Daxx. *J Cell Biochem.* 2006 Jul 1;98(4):895-911
- 16. Charette, S. J. et Landry, J. (2000):** The interaction of HSP27 with Daxx identifies a potential regulatory role of HSP27 in Fas-induced apoptosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 926, 126–131
- 17. Joza, N., Kroemer, G. Et Penninger, J.M.(2002):** Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. *Trends in Genetics*, vol.8
- 18. Juo, P. et al. (1998):** Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr. Biol.* 8, 1001–1008
- 19. Khelifi AF, D'Alcontres MS, Salomoni P.(2005):** Daxx is required for stress-induced cell death and JNK activation.; *Cell Death Differ.* 2005 Jul;12(7):724-33
- 20. Ko, Y. G. et al. (2001):** Apoptosis signal-regulating kinase 1 controls the proapoptotic function of death-associated protein (Daxx) in the cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 276, 39103 – 39106
- 21. Leal-Sanchez J, Couzinet A, Rossin A, Abdel-Sater F, Chakrabandhu K, Luci C, Anjuere F, Stebe E, Hancock D, Hueber AO.(2007):** Requirement for Daxx in mature T-cell proliferation and activation.; *Cell Death Differ.* 2007 Apr;14(4):795-806. Epub 2006 Nov 3
- 22. Daeyoung Lee, Jin Woo Kim, Taegun Seo, Sun Gwan Hwang, Eui-Ju Choi and Joonho Choe(2002):** SWI/SNF Complex Interacts with Tumor Suppressor p53 and Is Necessary for the Activation of p53-mediated Transcription; © 2002 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.
- 23. Leroy C, Deheuninck J, Reveneau S, Foveau B, Ji Z, Villenet C, Quief S, Tulasne D, Kerckaert JP, Fafeur V(2006):** HGF/SF regulates expression of apoptotic genes in MCF-10A human mammary epithelial cells.; *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Dec;1090:188-202.
- 24. Levine, M. et Tjian, R. (2003):** Transcription regulation and animal diversity *Nature*, vol.424, 10 july 2003 , [www.nature.com/nature](http://www.nature.com/nature)
- 25. Lin DY, Huang YS, Jeng JC, Kuo HY, Chang CC, Chao TT, Ho CC, Chen YC, Lin TP, Fang HI, Hung CC, Suen CS, Hwang MJ, Chang KS, Maul GG, Shih HM.(2006):** Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear

localization, and repression of sumoylated transcription factors.; Mol Cell. 2006, Nov 3;24(3):341-54

**26. Luciani JJ, Depetris D, Usson Y, Metzler-Guillemain C, Mignon-Ravix C, Mitchell MJ, Megarbane A, Sarda P, Sirma H, Moncla A, Feunteun J, Mattei MG.(2006):** PML nuclear bodies are highly organised DNA-protein structures with a function in heterochromatin remodelling at the G2 phase.; J Cell Sci. 2006 Jun 15;119(Pt 12):2518-31. Epub 2006 May 30

**27. Michaelson, J. S. et al. (1999):** Loss of Daxx, a promiscuously interacting protein, results in extensive apoptosis in early mouse development. Genes Dev. 13, 1918 -1923

**28. Michaelson, J. S. et Leder, P. (2003):** RNAi reveals anti-apoptotic and transcriptionally repressive activities of Daxx. J. Cell Sci. 116, 345–352

**29. Mlejnek, P. (2004):** Buněčná smrt. Vesmír 83, 368–471

**30. Moll UM, Wolff S, Speidel D, Deppert W.(2005):** Transcription- independent pro-apoptotic functions of p53; Curr Opin Cell Biol. 2005 Dec;17(6):631-6. Epub 2005 Oct 13

**31. Nefkens I, Negorev DG, Ishov AM, Michaelson JS, Yeh ET, Tanguay RM, Müller WE, Maul GG(2003):** Heat shock and Cd2+ exposure regulate PML and Daxx release from ND10 by independent mechanisms that modify the induction of heat-shock proteins 70 and 25 differently.; J Cell Sci. 2003 Feb 1;116(Pt 3):513-24

**32. Nguyen H, Sankaran S, Dandekar S.(2006):** Hepatitis C virus core protein induces expression of genes regulating immune evasion and anti-apoptosis in hepatocytes.; Virology. 2006 Oct 10;354(1):58-68. Epub 2006 Jul 28

**33. Perlman, R et al. (2001):** TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK

**34. Raoul, C. et al. (2002):** Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. Potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. Neuron 35, 1067 - 1083

**35. Raoul, C. et al. (2005):** Expression of a dominant negative form of Daxx in vivo rescues motoneurons from Fas (CD95)-induced cell death. J. Neurobiol. 62, 178 -188

**36. Roset R, Ortet L, Gil-Gomez G.(2007):** Role of BCL-2 family members on apoptosis: what we have learned from knock-out mice. ;Front Biosci. 2007 May 1;12:4722-30

- 37. Saffert RT, Kalejta RF(2007):** Human cytomegalovirus gene expression is silenced by daxx-mediated intrinsic immune defense in model latent infections established in vitro.; J Virol. 2007 Sep;81(17):9109-20. Epub 2007 Jun 27 .
- 38. Saha, A., Wittmeyer, J. et Cairns, B. R. (2006):** Chromatin remodeling: the industrial revolution of DNA around histones. Mol. Cell Biol. 97, 437–447  
The PML-nuclear body associated protein Daxx regulates the cellular response to CD 40. Cell Death and Differentiation 13,672-675
- 39. Salomoni, P. et Khelifi, A. F. (2006):** Daxx: death or survival protein? Trends in Cell. Biol. 15, 124 – 132
- 40. Salomoni, P. et Pandolfi, P. P. (2002):** The role of PML in tumor suppression. Cell 108, 165–170
- 41. Sansam CG, Roberts CW.(2005):** Epigenetics and cancer: altered chromatin remodeling via Snf5 loss leads to aberrant cell cycle regulation; Curr Opin Cell Biol. 2005 Dec;17(6):631-6. Epub 2005 Oct 13
- 42. Siegel, P. M. et Massague, J. (2003):** Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. Nat. Rev. Cancer 3, 807–821
- 43. Socolovsky, M.(2007):** Molecular insights into stress erythropoiesis.; Curr Opin Hematol. 2007 May;14(3):215-24
- 44. Song, J. J. et Lee, Y. J. (2003):** Effects of glucose concentration on activation of the ASK1-SEK1-JNK1 signal transduction pathway. J. Cell. Biochem. 89, 653–662
- 45. Song, J. J. et Lee, Y. J. (2003):** Role of the ASK1-SEK1-JNK1-HIPK1 signal in Daxx trafficking and ASK1 oligomerization. J. Biol. Chem. 278, 47245 – 47252
- 46. Storchová, Z. (2005):** O buněčném odpadu. Vesmír 84, 73–77
- 47. Sumbayev VV, Yasinska IM(2006):** Role of MAP kinase-dependent apoptotic pathway in innate immune responses and viral infection; Scand J Immunol. 2006 Jun;63(6):391-400
- 48. Takahashi Y., Valerie Lallemand-Breitenbach, Jun Zhu and Hugues de Thé (2004):** PML nuclear bodies and apoptosis; Oncogene (2004) 23, 2819–2824
- 49. Tang, J. et al. (2004):** A novel transcription regulatory complex containing death domain-associated protein and the ATR-X syndrome protein. J. Biol. Chem. 279, 20369–20377
- 50. Thomas MC, Chiang CM.(2006):** The general transcription machinery and general cofactors; Crit Rev Biochem Mol Biol. 2006 May-Jun;41(3):105-78

- 51. Torii S, Egan DA, Evans RA, Reed JC. (1999):** Human Daxx regulates Fas-induced apoptosis from nuclear PML oncogenic domains (PODs); EMBO J. 1999 Nov 1;18(21):6037-49
- 52. Yeung PL, Chen LY, Tsai SC, Zhang A, Chen JD.(2007):** Daxx contains two nuclear localization signals and interacts with importin alpha3.; : J Cell Biochem. 2007 Jul 27; [Epub ahead of print
- 53. Villunger A, Huang DC, Holler N, Tschopp J, Strasser A.(2000):** FAS ligand-induced C-Jun kinase activation in lymphoid cells requires extensive receptor aggregation but is dependent of DAXX, and Fas-mediated cell death does not involve DAXX, RIP or RAIDD; J Immunol. 2000 Aug 1;165(3):1337-43
- 54. Weston, C. R. et Davis, R. J. (2002):** The JNK signal transduction pathway. Curr. Opin. Genet. Dev. 12, 14 – 21
- 55. Woodhall DL, Groves IJ, Reeves MB, Wilkinson G, Sinclair JH.(2006):** Human Daxx-mediated repression of human cytomegalovirus gene expression correlates with a repressive chromatin structure around the major immediate early promoter.; J Biol Chem. 2006 Dec 8;281(49):37652-60. Epub 2006 Oct 11
- 56. Xue, Y. et al. (2003):** The ATRX syndrome protein forms a chromatin – remodeling complex with Daxx and localizes in promyelocytic leukemia nuclear bodies. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 10635–10640
- 57. Zhao H, Dean A.(2005):** Organizing the genome: enhancers and insulators; Biochem Cell Biol. 2005 Aug;83(4):516-24